昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2011, 54(2): 218 - 223 ISSN 0454-6296

赤拟谷盗 HSP70 基因克隆和竞争定量 PCR 检测

苏丽娟[1], 董晓慧[2], 尹新明[2,*]
(1. 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 为研究赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 受到热胁迫后高度保守的热激蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)基因的表达变化, 本研究扩增了 681 bp 的赤拟谷盗 *hsp70* 片段, 编码 227 个氨基酸残基, GenBank 登录号为 HM345948。同源性分析表明: 赤拟谷盗 *hsp70* 核苷酸序列与马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *hsp70*(GenBank 登录号: AF322911.1)同源性最高, 为 97%; 其推测的蛋白序列与马铃薯甲虫、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 的 HSP70 蛋白均有 94% 以上的同源性。利用 RT-PCR 技术得到与赤拟谷盗 *hsp70* 进行竞争定量的内部竞争物, 以等量的目标 cDNA 和一系列稀释的竞争模板进行竞争 PCR 扩增, 构建了 *hsp70* 的竞争定量 PCR 检测体系, 该体系标准曲线的线性方程为 $Y = 1.032X - 1.618$ ($r^2 = 0.975$)。这些结果为赤拟谷盗的 *hsp70* 定量检测提供了方便, 并为热控技术防治害虫提供了基础资料。

关键词: 赤拟谷盗; 热激蛋白 70; 竞争定量 PCR; 内部竞争物; 同源性分析
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)02-0218-06

Cloning and quantitative competitive PCR assay of HSP70 gene in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

SU Li-Juan[1], DONG Xiao-Hui[2], YIN Xin-Ming[2,*] (1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To study the expression changes of heat shock protein 70 (a highly conserved protein) in *Tribolium castaneum* after exposure to heat stress, a fragment of 681 bp encoding for HSP70 was amplified and sequenced from *T. castaneum*. The fragment encoded 227 amino acid residues with the GenBank accession no. HM345948. The result of homology analysis showed that this fragment shared 97% identity with *hsp70* from *L. decemlineata* (AF322911.1). Comparison of the deduced amino acid sequences of HSP70 in *T. castaneum* with those in *Leptinotarsa decemlineata*, *Mamestra brassicae*, *Drosophila melanogaster* and *Liriomyza sativae* indicated that they shared more than 94% identity. The internal competitor used in quantitative competitive PCR was obtained by RT-PCR. The detection system of *hsp70* was constructed by PCR amplification using the same quantity of target cDNA and a series of diluted internal competitor as template. The linear equation of standard curve was $Y = 1.032X - 1.618$ ($r^2 = 0.975$). This study provides a very convenient method for the quantitation of the *hsp70* expression changes in *T. castaneum* and offers the basic data for the prevention and control of pests using thermal control technology.

Key words: *Tribolium castaneum*; heat shock protein 70; quantitative competitive PCR; internal competitor; homology analysis

热激蛋白是热应激条件下迅速合成的一类蛋白质, 其中 HSP70 家族是最保守最重要的热应激蛋白家族, 包括分子量为 68, 72, 73, 75 和 78 kD 等多种蛋白。HSP70 常被称为分子伴侣(chaperones), 可以帮助新生肽链正确折叠并协助蛋白质在细胞间转运(Dahlhoff and Rank, 2007)。热应激时, 昆虫细胞中某些蛋白质肽链伸展, 失去原来的盘旋及折叠状态, 改变了分子空间构型, 甚至使寡聚复合物降解, 丧失原有的功能。此时 HSP70 高浓度聚集在染色质及核质内, 并以特殊方式与解聚染色质相互作用, 防止染色质复合物的降解, 从而维护昆虫细胞内环境的稳定, 提高昆虫细胞对应激源的耐受

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(092102110183); 河南省创新人才培养工程(074-2005-10018)
作者简介: 苏丽娟, 女, 1972 年生, 河南宜阳人, 博士, 讲师, 从事昆虫和动物资源学研究, E-mail: sulijuan816@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xinmingyin@hotmail.com
收稿日期 Received: 2010-07-06; 接受日期 Accepted: 2010-12-19

性，防止昆虫细胞凋亡，加速受损昆虫细胞的修复（王海鸿和雷仲仁，2005）。

当昆虫受到热激时，热激蛋白基因的转录被激活，正常温度下存在的大多数 mRNA 的翻译降低或受到抑制。在对昆虫 HSP70 转录水平上研究时，mRNA 的定量成为一个难点。常规半定量 PCR 技术只能定量终点，无法对 *hsp70* 进行动态变化过程的定量；Northern 技术虽很成熟，但需要放射性标记且灵敏度有限；荧光定量 PCR 克服了以上缺点，但需要专门的仪器，代价较高（付春华等，2005）。竞争定量 PCR（quantitative competitive PCR，QC-PCR）技术是在 PCR 基础上改进并发展起来的，具有简便、低成本、灵敏等优点，不需要专门的仪器。经过多年发展、完善，它已发展成为一种通用的 PCR 技术，获得广泛应用（王恒波等，2009）。而在竞争定量 PCR 中，竞争性对照模板的构建是定量的关键，竞争性对照模板的扩增效率要尽量和目标序列一致，二者竞争引物、核苷酸和聚合酶，且通过琼脂糖凝胶电泳可以将它们的 PCR 产物很方便地区分开来（司兴奎等，2008）。

目前对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* HSPs 的研究有 Altincicek 等（2008）鉴定出用脂多糖处理过的昆虫高表达的基因中有 *hsp68* 和 *hsp27*，认为 *hsps* 与昆虫免疫有重要关系。本研究以重要的粮仓害虫赤拟谷盗为研究对象，旨在找出赤拟谷盗的 *hsp70* 片段，构建对赤拟谷盗 *hsp70* 进行竞争定量 PCR 的内部竞争模板，建立其竞争定量 PCR 检测体系。为研究赤拟谷盗受到热胁迫后 *hsp70* 的表达变化，并为热控技术防治害虫和在昆虫中构建竞争定量 PCR 系统奠定一定的科学基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　材料来源：赤拟谷盗成虫和幼虫（4 龄）采自郑州郊区农家，在实验室中采用 37℃，相对湿度 75% ~80% 的条件人工饲养（恒温培养箱）。

1.1.2　试剂和酶：Trizol 试剂（Gibco 公司），反转录试剂盒（MBI 公司），Taq plus DNA 聚合酶（Sangon 公司），dNTP（Sangon 公司），PCR 产物纯化试剂盒（Sangon 公司），其他为国产或进口分析纯试剂。

1.2　方法

1.2.1　样品处理及 RNA 提取：将供试昆虫 40℃水浴 30 min，取出后立即放入液氮中研磨，将彻底研磨后的样品放入 1.5 mL 离心管中，用 Trizol 加氯仿和异丙醇提取 RNA。

1.2.2　反转录及目的片段 PCR 扩增：以提取的 RNA 为模板，用 MBI RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第一链，再以第一链为模板合成赤拟谷盗 *hsp70* 片段。PCR 反应条件为：94℃预变性 5 min；然后进行 30 个循环，条件为 94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1.5 min；最后 72℃延伸 10 min，反应结束后 4℃保存备用。目的基因引物设计参考 GenBank 检索的十几种昆虫的 *hsp70*（Mahroof *et al*.，2005），由上海 Sangon 公司合成，为 SP：5′-TCCAGAGGAAATCAGTTCTA-3′，AP：5′-ACCAGAATACCAAAGATCCAT-3′。PCR 产物纯化用 Sangon 公司的产物纯化试剂盒。

1.2.3　转化及酶切：纯化后将 PCR 产物连接到 pGEMT-easy 载体（Promega Corp，Madison，WI，USA）上，转化入大肠杆菌 DH5α，提取质粒用 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定后测序（大连宝生物）。

1.2.4　内部竞争物的 PCR 扩增：引物同上，将退火温度降为 53℃，其余 PCR 条件同上。回收胶中的竞争物条带，转化后提质粒酶切鉴定。用紫外分光光度计测定 DNA 浓度并进行 6 个浓度的系列稀释：100 ×，80 ×，64 ×，32 ×，16 ×，8 ×。

1.2.5　竞争性 PCR 及竞争性 PCR 的标准曲线绘制：将每个 PCR 管中加入等量的目标 cDNA 以及相应浓度系列稀释后不同浓度的竞争物作为模板，进行 PCR 扩增。PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳后照相，用光密度分析仪作数字处理。用 SPSS 软件进行数据处理，绘制竞争性 PCR 的标准曲线，并得到标准曲线的线性方程。

2　结果与分析

2.1　赤拟谷盗 HSP70 基因片段克隆

在合适的退火温度 55℃ PCR 扩增得到单一的条带，琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1。图 1 中赤拟谷盗幼虫和成虫的 cDNA 样品均在约 700 bp 处出现特异性条带，可初步判断得到了特异性强的赤拟谷盗 *hsp70* 靶基因。

2.2　HSP70 基因序列分析

将重组质粒测序，得到编号为 ZBS1062 的基因序列，序列长 681 bp，结果如图 2。

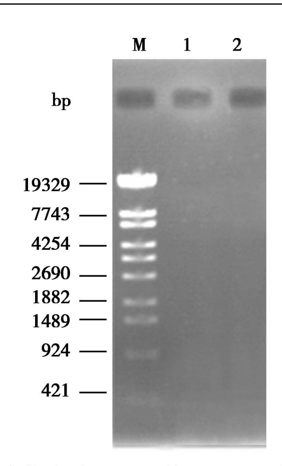


图 1 赤拟谷盗 *hsp70* 的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR of *hsp70* from *Tribolium castaneum*

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1：幼虫热激处理 Heat shock of larvae；2：成虫热激处理 Heat shock of adults.

将 *hsp70* 的核苷酸序列通过 GenBank 的 Blast 与其他物种 *hsp70* 的序列对比，赤拟谷盗 *hsp70*（HM345948）与鞘翅目马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *hsp70*（AF322911.1）同源性最高，为 97%，与 *Diguetia mojavea* 的 *hsp70*（EF537115.1）有 74% 的同源性，与已报道的赤拟谷盗 *hsp70*（AY769606）的 589 bp 基因片段同源性较低，仅有 42%，可能为 *hsp70* 家族的不同基因。利用 DNAman 软件分析该片段推测的氨基酸序列，发现其与马铃薯甲虫有 96% 的同源性，与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 和美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 均有 94% 以上的同源性（图 3）。可以断定此基因为目的基因，即赤拟谷盗 *hsp70* 的基因片段，GenBank 登录号为 HM345948，编码 227 个氨基酸残基。疏水区域预测显示该蛋白很少能形成疏水区域。TMpred-Prediction of Transmembrane Regions and Orientation 进行蛋白跨膜结构域预测，表明 HSP70 蛋白没有正向或反向的跨膜区域。

TCC AGA GGA AAT CAG TTC TAT GGT GTT GAC TAA AAT GAA GGA AAC TGC AGA GGC GTA TTT GGG AAG TTC GAT
CAG AGA TGC CGT TAT AAC AGT GCC AGC TTA CTT CAA CGA CTC CCA GAG GCA AGC CAC GAA GGA TGC AGG TGC
TAT TGC TGG CTT AAA CGT TTT GAG GAT TAT AAA CGA ACC AAC AGC AGC TGC TCT AGC ATA CGG ACT CGA CAA
GAA CTT GAA AGG TGA ACG AAA TGT GCT CAT CTT CGA CTT GGG TGG TGG CAC TTT TGA TGT TTC CAT ATT GAC
CAT CGA TGA AGG ACT ATT CGA AGT GAG GGC TAC AGA CAC ACA TCT TGG TGG AGG AGA CTT TGA TAA CCG TCT
AGT CAA TCA TCT AGC AGA TGA GTT CAA GAG AAA ATA CAG AAA GGA CCT CAA TCC TAG GTC TCT GCG CAG GTT
GAG GAC AGC AGC CGA GAG AGC CAA ACG TAC ACT CTC TTG TAC AGA AGC AAC CAT CGA AAT TGA TGC TCT TTT
CGA AGG CAT TGA TTT CTA CAC CAA AAT CAG CAG AGC CAG GTT TGA GGA ACT CTG TTC TGA TCT GTT CAG AGG
GAC GCT GCA GCC AGT TGA GAA AGC TTT GAA CGA CGC CAA AAT GGA CAA GGG ACA GAT TCA TGA TGT AGT CCT
TGT CGG AGG GTC CAC CAG AAT ACC AAA GAT CCA

图 2 重组质粒的 DNA 序列

Fig. 2 The DNA sequence of recombination plasmid

Tribolium castaneum	PEEISSMVLTKMKETAEAYLGSSIRDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRIINE	60
Leptinotarsa decemlineata	PEEISSMVLTKMKETAEAYLGSSIRDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRIINE	77
Mamestra brassicae	PEEISSMVLVKMKETAEAYLGTTIRDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRIINE	172
Drosophila melanogaster	PEEISSMVLVKMKETAEAYLGTTIRDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRIINE	172
Tribolium castaneum	PTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEG.LFEVRAT..DTHLGGGDFD	117
Leptiotarsa decemlineata	PTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVRATAGDTHLGGGDFD	137
Mamestra brassicae	PTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVRATAGDTHLGGEDFD	232
Drosophila melanogaster	PTAAALAYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDEGSLFEVRATAGDTHLGGEDFD	232
Tribolium castaneum	NRLVNHLADEFKRKYRKDL..NPRSLRRLRTAAERAKRTLSC.TEATIEIDALFEGIDFY	174
Leptinotarsa decemlineata	NRLVNHLADEFKRKYRKDLRSNPRSLRRLRTAAERAKRTLSSSTEATIEIDALFEGIDFY	197
Mamestra brassicae	NRLVNHLADEFKRKFKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTLSSSTEATIEIDALFEGHDFY	292
Drosophila melanogaster	NRLVNHLADEFKRKFKKDLRSNPRALRRLRTAAERAKRTLSSSTEATIEIDALFEGHDFY	292
Tribolium castaneum	TKISRARFEELCSDLFRGTLQPVEKALNDAKMDKGQIHDVVLVGGSTRIPKIQ	227
Leptinotarsa decemlineata	TKISRARFEELCSDLFRGTLQPVEKALNDAKMDKGQIHDVVLVGGSTRIPKIQ	250
Mamestra brassicae	TKVSRARFEELCGDLFRGTLQPVEKALNDAKMDKSQIHDIVLVGGSTRIPKVQ	345
Drosophila melanogaster	TKVSRARFEELCGDLFRGTLQPVEKALNDAKMDKSQIHDIVLVGGSTRIPKVQ	345

图 3 赤拟谷盗 *hsp70* 片段推测的氨基酸序列与其他昆虫的 HSP70 蛋白的同源性比较

Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid sequences of *hsp70* in *Tribolium castaneum* and other insects

利用 ClustalX 将 14 种来源不同的 HSP70 序列同源性较高的昆虫进行系统进化分析（图 4），结果表明赤拟谷盗与来源于鞘翅目叶甲科的马铃薯甲虫亲缘关系较近，与鞘翅目步甲科的光滑鳖甲 *Anatolica polita borealis* 的亲缘关系次之。而同属双翅目的花蝇科的葱蝇 *Delia antiqua*、蝇科的刺吮鳄蝇 *Glossina morsitans*、潜蝇科的美洲斑潜蝇、实蝇科的苹果实蝇 *Rhagoletis pomonella* 和果蝇的亲缘关系最近，同属一个分支，它们与鞘翅目亲缘关系较远。这些系统发育分析与已知的系统进化关系相同，表明保守性较强的 *hsp70* 可以作为系统进化分析的标志基因。

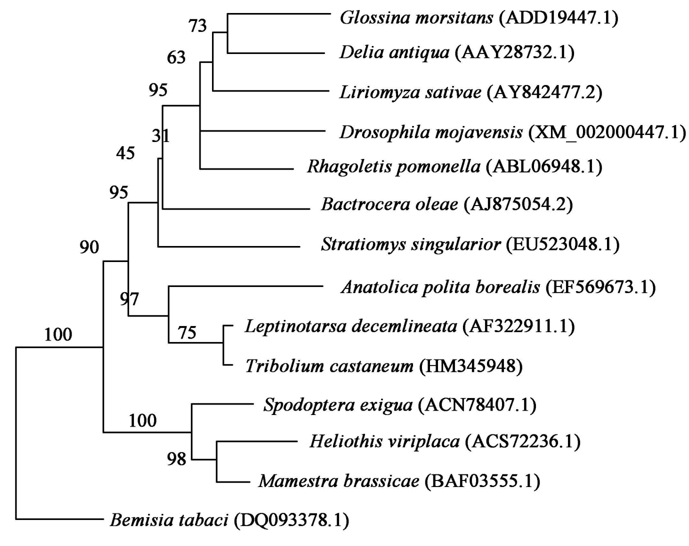


图 4　用 ClustalX 构建 14 种昆虫 HSP70 蛋白的系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic tree based on the amino acid sequence alignment of HSP70 in 14 insects with ClustalX

2.3　PCR 竞争物的制备

在低结合温度 53℃下，经 PCR 扩增，其 PCR 产物与高结合温度 55℃下的 PCR 产物共同琼脂糖凝胶电泳，检测结果如图 5。可以看出在低结合温度 53℃下，可以得到一系列分子量不等的 PCR 产物。从分子量不等的 PCR 产物中，选取分子量约 1 100 bp 的带进行胶回收作为竞争 PCR 的内部竞争模板。

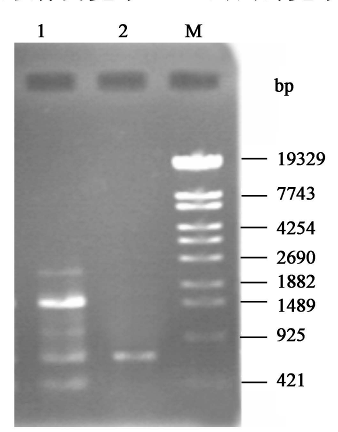


图 5　竞争性 PCR 内部竞争物

Fig. 5　Internal competitor for competitive PCR

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1：退火温度 53℃ Amplified product at an annealing temperature of 53℃；2：退火温度 55℃ Amplified product at an annealing temperature of 55℃.

2.4　竞争性 PCR 检测 HSP 的量和竞争性 PCR 的标准曲线

将系列稀释后的竞争物分别同等量的赤拟谷盗 cDNA 在同一试管中进行 PCR，彼此竞争引物和其他反应底物。由此得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 6 所示，分别在 700 和 1 100 bp 左右有两条明显带出现。将竞争 PCR 的结果用光密度分析仪进行分析并制作标准曲线，结果如图 7 所示。由图 7 可以看出竞争物浓度和竞争物 PCR 产物与目标 cDNA 的 PCR 产物的比值呈线性相关，标准曲线方程为 $Y = 1.032X - 1.618$ ($r^2 = 0.975$)，也表明本实验所建立的 QC-PCR 具有较高的灵敏度和准确度。

3　讨论

热激蛋白的出现与细胞的耐热性潜力发挥有关，热激蛋白可与逆境下解析蛋白质结合，防止其自发折叠成不溶状态（Carper *et al.*, 1987；Daugaard *et al.*, 2007）；热激蛋白也可以利用水解 ATP 的能量，维持蛋白质的可溶状态，并进一步使之复性，从

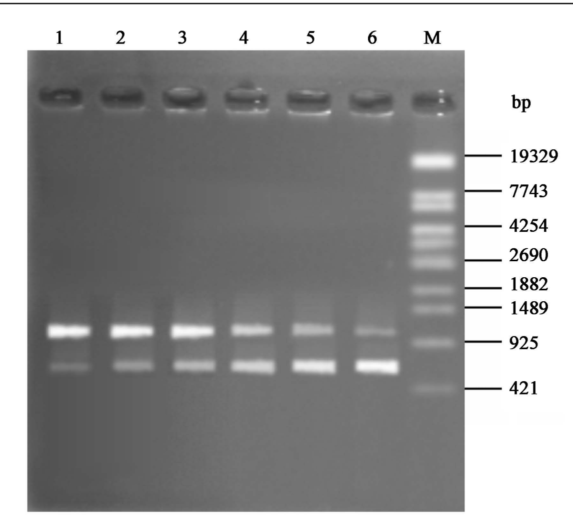


图 6 竞争性定量 PCR 检测结果

Fig. 6 The result of QC-PCR

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1-6：分别稀释 100，80，64，32，16 和 8 倍的竞争物以及目标基因的 PCR 结果 The PCR results of 100-, 80-, 64-, 32-, 16- and 8-fold diluted competitor and target gene, respectively.

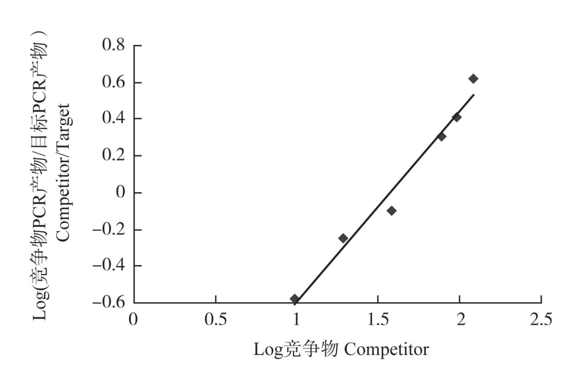


图 7 竞争性 PCR 的标准曲线

Fig. 7 The standard curve for competitive PCR

而使昆虫获得耐热性（Dahlhoff *et al.*，2008）。有研究发现无翅红蝽 *Pyrrhocoris apterus* 通过 *hsp70* 的上调表达抵御寒冷和高热的伤害，当温度在 22～25℃波动时，表达可上调 3 倍（Koštál and Tollarová-Borovanská，2009）。*hsp70* 的上调表达是昆虫滞育越冬的必要条件，如果缺乏 HSPs 不会影响昆虫进入滞育期，但会严重影响昆虫蛹期对低温的耐受能力（Rinehart *et al.*，2007）。因此研究 HSP70 在鞘翅目昆虫赤拟谷盗生长阶段中的作用，有助于揭开 HSP70 对昆虫发育的影响机制。而做这些研究的基础是克隆出 *hsp70* 的片段，并能进行准确定量。本实验中克隆的赤拟谷盗 *hsp70* 片段，与多种昆虫同源性很高，其氨基酸序列与马铃薯甲虫、果蝇及美洲斑潜蝇的 *hsp70* 的氨基酸序列均有 94% 以上的同源性，因此该片段可为以后研究赤拟谷盗 *hsp70* 提供基础。该片段与已报道的赤拟谷盗 *hsp70*（GenBank 登录号：AY769606）的 589 bp 基因片段同源性较低，仅有 42%，又经 Blast 分析发现，*hsp70*（GenBank 登录号：AY769606）位于赤拟谷盗的第 2 条染色体基因组的 6 860～6 865 kb 之间，而本实验扩增的 *hsp70*（GenBank 登录号：HM345948）位于赤拟谷盗的第 7 条染色体基因组的 18 630～18 640 kb之间，两条片段位于不同的染色体上，可能为 *hsp70* 家族的不同基因。从系统进化分析看，赤拟谷盗与来源于鞘翅目叶甲科马铃薯甲虫亲缘关系较近，与鞘翅目步甲科的光滑鳖甲的亲缘关系次之。

传统的 RNA 定量方法（半定量 PCR、Northern blotting）存在不精确和灵敏度低的缺点，本研究选择竞争定量 PCR 通过构建内参竞争模板，同样本在同一个反应管内扩增，对样本进行质控监测，排除了假阳性结果，具有简便、定量较准确和需要设备简单的优点。但竞争定量 PCR 要求反应体系中扩增效率（Ev）值不变。Ev 的影响因素有：引物和靶序列的结合能力（G + C% 及突变）、扩增产物的长度、G + C 含量；模板含量、DNA 聚合酶、反应液成分变化；不同标本间 DNA 聚合酶抑制物的存在情况；循环扩增仪上不同位置的差异（王恒波等，2009）。由于我们构建的竞争性模板（1 100 bp）同目标模板（681 bp）具有相同的引物结合位点，二者相差 420 bp，这样降低了基因本身在 PCR 过程中造成的干扰，为研究赤拟谷盗的 HSP70 在转录水平上的表达规律提供了方便而又低廉的方法。

目前，有关热激蛋白的研究，主要集中在利用动植物的热激蛋白基因来提高它们的耐热性，从而产生有利于人们生产生活的作用（王海鸿和雷仲仁，2005）。就昆虫来说，对它们的热激蛋白的研究还不是很多，一些基础的研究还有待加强。本实验仅克隆了赤拟谷盗的 *hsp70* 的 681 bp 片段，并建立了其竞争定量 PCR 检测体系，而对于赤拟谷盗的 HSP70 在转录水平上的表达规律，赤拟谷盗各种龄期及虫态之间 *hsp70* 表达量的差异和规律均有待进一步研究。

参 考 文 献（References）

Altincicek B, Knorr E, Vilcinskas A, 2008. Beetle immunity: identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(5): 585－595.

Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW, 1987. Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res.*, 47(20): 5249–5255.

Dahlhoff EP, Fearnley SL, Bruce DA, Gibbs AG, Stoneking R, McMillan DM, Deiner K, Smiley JT, Rank NE, 2008. Effects of temperature on physiology and reproductive success of a montane leaf beetle: implications for persistence of native populations enduring climate change. *Physiol. Biochem. Zool.*, 81(6): 718–732.

Dahlhoff EP, Rank NE, 2007. The role of stress proteins in responses of a montane willow leaf beetle to environmental temperature variation. *J. Biosci.*, 32(3): 477–488.

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M, 2007. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581(19): 3702–3710.

Fu CH, Chen XP, Yu LJ, 2005. The application and development of real-time fluorescent quantitative PCR. *Acta Laser Biology Sinica*, 14(6): 466–471. [付春华, 陈孝平, 余龙江, 2005. 实时荧光定量 PCR 的应用和进展. 激光生物学报, 14(6): 466–471]

Koštáls V, Tollarová-Borovanská M, 2009. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS One*, 4(2): e4546.

Mahroof R, Zhu KY, Neven L, Subramanyam B, Bai J, 2005. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 141(2): 247–256.

Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SA, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(27): 11130–11137.

Si XK, Zhang JP, Chen JH, Gu WJ, 2008. Establishment of a quantitative competitive RT-PCR assay for detection of porcine IL-12p40 mRNA. *Journal of South China Agricultural University*, 29(4): 91–94. [司兴奎, 张济培, 陈建红, 顾万军, 2008. 猪 IL-12p40 竞争定量 RT-PCR 检测方法的建立. 华南农业大学学报, 29(4): 91–94]

Wang HB, Guo JL, Chen PH, Que YX, Chen RK, Xu LP, 2009. Establishment of a quantitative competitive PCR assay for detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 30(10): 1511–1516. [王恒波, 郭晋隆, 陈平华, 阙友雄, 陈如凯, 许莉萍, 2009. 宿根矮化病菌的竞争定量 PCR 检测方法建立. 热带作物学报, 30(10): 1511–1516]

Wang HH, Lei ZR, 2005. Current developments of heat shock proteins in insect. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(10): 2023–2034. [王海鸿, 雷仲仁, 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. 中国农业科学, 38(10): 2023–2034]

(责任编辑：赵利辉)